

“Ciencia y Tecnología”, Año 11, Nº 4, 2015, 139-153

Efecto inmunomodulador de *Brassica oleracea* L. var. *Botrytis* “coliflor” sobre células inmunes en *Mus musculus* var. *Swiss* isogénicos con cáncer experimental

Anabel D. González-Siccha¹; Víctor C. Sabana Gamarra²

¹ Docente Principal del Departamento de Bioquímica- Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo; agonzalez@unitru.edu.pe.

² Docente Principal, Cesante del Departamento de Farmacología- Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo.

Recibido: 11-05-2015

Aceptado: 27-08-2015

RESUMEN

Objetivo: Determinar efecto inmunomodulador del extracto de *Brassica oleracea* L. var. *Botrytis* “coliflor” sobre células inmunes en *Mus musculus* var. *Swiss* Isogénicos con cáncer experimental. **Material biológico:** Coliflor recolectada en Simbal-Trujillo y ratones 35-45 g. **Método:** Se indujo cáncer con Benzopireno: Grupo control (GC sin tratamiento), tratados GPa (Quercitina: D= 7.14 mg/Kg/pc), GP1 (ESPC: D=10mg/Kg/pc); GP2 (ESPC: D=20mg/Kg/pc). Se determinó: título de anticuerpos, conteo total (CTL) y diferencial (CDL) de leucocitos $\times 10^9/l$ células, durante 0, 30, 60 y 90 días. **Resultados:** Se demostró efecto inmunomodulador cuando GPa, GP1 y GP2, elevaron título de anticuerpos comparados con GC ($P < 0.05$). Presenta diferencia CTL, porcentaje de neutrófilos, linfocitos y monocitos, comparados con GC ($P < 0.05$). A los 30 días, se observó leucocitosis con mayor porcentaje en neutrófilos y monocitos pero menor en linfocitos. A los 90 días, GC presentó leucopenia siendo las células linfocitos, los más afectados ($P < 0.05$). Entre GPa, GP1 y GP2 no presentó diferencia significativa ($P > 0.05$), demostrando que el ESPC tiene el mismo efecto que el patrón quercitina con propiedades antiinflamatoria y antioxidante, como respuesta inmune y defensa favorable contra el cáncer. Por lo tanto, se **concluye** que el ESP de la coliflor presenta efecto inmunomodulador porque incrementó el título de anticuerpos y linfocitos, y se le atribuye a la quercitina cuyo efecto dual es potenciado por la presencia del flavonoide Kaempferol en el ESPC.

Palabras clave: *Brassica oleracea* L. var. *Botrytis*, *Mus musculus* var. *Swiss* Isogénicos, inmunomodulador, antitumoral, cáncer experimental.

ABSTRACT

Objective: To determine immunomodulatory effect of the extract of *Brassica oleracea* L. var. *Botrytis* "Cauliflower" on immune cells in *Mus musculus* var. *Swiss* Isogenic with experimental cancer. **Biological material:** Cauliflower collected in Simbal-Trujillo and 35-45 g mice. **Method:** cancer was induced with Benzopyrene: Control Group (GC without treatment), and treated GPa (Quercitina: D= 7.14 mg/Kg/bw), GP1 (ESPC: D=10mg/Kg/bw); GP2 (ESPC: D=20mg/Kg/bw). It was determined: antibody titer, total count (CTL) and differential (CDL) leukocyte $\times 10^9/l$ cells during 0, 30, 60 and 90 days. **Results:** immunomodulatory effect was demonstrated when GPa, GP1 and GP2 raised antibody titer compared to GC between groups ($P < 0.05$). At 30 days, we observed leukocytosis with the highest percentage in neutrophils and monocytes but lower lymphocytes. At 90 days, GC presented leukopenia being the most affected lymphocyte cells ($P < 0.05$). Among GPa, GP1 and GP2 were not significance ($P > 0.05$), demonstrating that the ESPC has the same effect as quercetin pattern with anti-inflammatory and antioxidant properties, such as immune response and pro- defense against cancer. Therefore, it is **concluded** that the ESP cauliflower had immunomodulatory effect because of increased antibody titer and lymphocytes and is attributed to quercetin, whose dual effect is enhanced by the presence of flavonoid kaempferol in ESPC.

Key words: *Brassica oleracea* L. var. *Botrytis*, *Mus musculus* var. *Swiss* Isogénicos, immunomodulatory, antitumor, experimental cancer.

I. INTRODUCCION

El cáncer es una enfermedad multifactorial, de etiología variada donde la edad, el sexo, la raza, los factores genéticos, la dieta, el estilo de vida y el medio ambiente en general, actúan sobre el genoma de las células como iniciadores o promotores en la transformación celular; produciendo proliferación descontrolada de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos. (Murray R. et al, 2013:715).

El cáncer aparece como consecuencia de una serie de alteraciones en el ADN que culminan en una proliferación celular sin control (Abbas et al, 2011:397), implica mecanismos relacionados con la activación de receptores de superficie celular, activación o inhibición de enzimas, factores transcripcionales, apoptosis, citotoxicidad celular, mutaciones en genes y expresión de oncogenes (Murray et al, 2013:708-10). La mutación de genes, da lugar a proteínas no funcionales, favoreciendo la proliferación celular sin control (Baker y Díaz, 2013: 5).

Se considera carcinógenos a aquellos agentes físicos, químicos o biológicos capaces de aumentar la frecuencia de aparición de neoplasias malignas, ya sea directamente o a través de un metabolito electrofílico (De la Peña et al, 2012:14), algunos requieren una activación metabólica para expresar su potencial carcinogénico, que influyen en el crecimiento y en la muerte celular, mediante la modificación de la fisiología normal de órganos y sistemas específicos, alterando el ciclo celular. (Murray R. et al, 2013:698). Entre los carcinógenos químicos, tenemos al 3,4-Benzo(a)pireno (Bp), que se encuentra en el humo del tabaco, en solventes usados en la industria, como contaminantes de alimentos que generan compuestos capaces de desarrollar cáncer principalmente del tracto gastrointestinal (Franco-Tobón et al, 2013:101).

Los tumores malignos son clones de células que tienen tasas de mutación muy altas. Esto significa que muchas de ellas expresarán proteínas mutantes que dan lugar a péptidos que no están presentes en células normales, con potencia antigénica (por ejemplo, pueden perder un antígeno tumoral, disminuir la expresión de MHC, secretar citosinas inflamatorias o inducir células T reguladoras en lugar de efectoras que suprimen la respuesta inmunitaria); dichos péptidos inducen una respuesta adaptativa al tumor, que serán capaces de evadir la respuesta inmunitaria y aparece cáncer. (MacPherson y Austin, 2013:46).

Al formarse los tumores, estos expresan antígenos que pueden inducir respuestas inmunes como humoral y celular en el huésped (Abbas et al, 2011:416). En un comienzo, cuestionaron la importancia de la vigilancia inmune, que es la capacidad del de reconocer y eliminar células tumorales; sin embargo hoy en día, es vista como un arma terapéutica en el tratamiento del cáncer, (Rivas et al, 2011: 90)

El sistema de defensa puede tener lugar con la participación de células (inmunidad celular) y/o de anticuerpos (inmunidad humoral). Algunos, moléculas en la defensa son innatos, están presentes desde el nacimiento y no dependen de la presencia de antígenos. Otros son adquiridos y se encuentran en pequeñas cantidades antes de un estímulo antigénico (Boticario y Cascales, 2013:9-10).

La inmunidad humoral depende de los linfocitos B y de sus productos de secreción, los anticuerpos (Inmunoglobulinas) que actúan en la defensa contra microorganismos extracelulares. (Abbas et al, 2011:16). Tras su activación, los linfocitos B proliferan y se diferencian en células plasmáticas que segregan diversas clases de anticuerpos con funciones diferentes, pero dotados de la misma especificidad frente a un antígeno. El lugar de unión antigénica de los anticuerpos coincide con los de la superficie celular (receptores de linfocitos B) que reconocen al antígeno; los polisacáridos y los lípidos sobre todo estimulan la secreción de anticuerpos de la clase Ig M; los antígenos proteínicos, en virtud de la acción de los linfocitos T cooperadores suscitan la producción de diversas clases de anticuerpos (IgG, IgA, IgE). La inmunidad adaptativa está representada por los anticuerpos y por los linfocitos T. (Abbas et al, 2011:13,16).

La inmunidad celular es tarea de los linfocitos T y de sus productos, como las citosinas que intervienen en la destrucción de los microorganismos intracelulares y células tumorales. (Abbas et al, 2011:15). Los linfocitos T pueden dividirse en citotóxicos CD8+ y linfocitos T cooperadores

CD4+, productores de citocinas que a su vez influyen en la citotoxicidad y en la respuesta humoral. (Arango et al, 2008:195).

Investigaciones desarrolladas por Castellanos-Puerto et al (2006:4), observaron que se modifican los niveles leucocitarios en ratones cuando estos son sometidos al estrés porque el estrés provoca cambios sustanciales en el sistema neuroinmunoendocrino metabólico; de forma que se pueda influenciar el desarrollo enfermedades.

La evaluación del leucograma, es parte integral del diagnóstico, porque da información muy valiosa sobre el estado del sistema inmune; demasiados o muy pocos leucocitos de una clase puede contribuir a encontrar la causa de una infección, definir la presencia de una reacción alérgica y evaluar la presencia de enfermedades tales como leucemias (Bernard et al, 2005:586).

Los leucocitos se diferencian en células como: los neutrófilos o PMN, son los más abundantes en la sangre, intervienen en la inflamación aguda, son cruciales en la defensa contra bacterias y hongos, tienen un periodo de vida corta. (MacPherson y Austin, 2013:18). Los linfocitos son los leucocitos de menor tamaño, son las únicas células capaces de reconocer diversos antígenos y distinguirlos específicamente e intervienen en la inmunidad adaptativa, específica y de memoria. (Abbas et al, 2011:49) Los monocitos son mayor tamaño; experimentan una atracción activa hacia los focos inflamatorios, donde se diferencian a macrófagos. (Abbas et al, 2011:507) Anexo 2.

En el leucograma, los leucocitos destacan por ser los efectores celulares de la respuesta inmunitaria; es decir, intervienen y participan de forma muy activa en la defensa del organismo contra agentes infecciosos o sustancias extrañas; organismo bien como productoras de anticuerpos (linfocitos) o participando en la fagocitosis de microorganismos intracelulares o encapsulados (neutrófilos, eosinófilos, basófilos y monocitos) (Abbas et al, 2011:49) (MacPherson y Austin, 2013:14).

Los mecanismos del sistema inmune en la protección contra tumores son diversos, donde están involucrados los mecanismos efectores celulares, humorales, y de la inmunidad innata, aunque los celulares parecen ser los más efectivos en la eliminación de células transformadas. (Arango et al, 2008:196). La inmunoterapia, son procedimientos que proporcionan al organismo elementos derivados del sistema inmunológico para atacar a las células tumorales o que estimulan al propio sistema inmune del paciente a que reaccione y destruya las células cancerosas. (Gavilondo, 2014:220).

Investigaciones manifiestas una relación entre la ingesta de verduras crucíferas y el riesgo de cáncer, y se tiene a la familia Crucíferas, género *Brassica*, como coliflor, repollo y brócoli, que son ricas en nutrientes, entre ellos, varios carotenoides (betacaroteno, luteína, zeaxantina); vitaminas C, E y K; folato; y minerales; también son una buena fuente de fibra, contienen vitamina B6, ácido fólico en combinación con otras vitaminas del complejo B, indol-3-carbinol y flavonoides, y se le atribuyen propiedades anticancerígenas. (Hayes et al, 2008:73-74). (Eid et al, 2013:48).

Se ha observado que el consumo de la col de Bruselas incrementa la enzima glutatión S-transferasa (GST) en plasma. La (GST) desintoxica carcinógenos y suprime la carcinogénesis. (Eid et al, 2013:57), porque presentan compuestos antioxidantes hidrosolubles: vitamina C y fenoles, como liposolubles (carotenoides), que contribuyen a la defensa del envejecimiento celular. (Quiñones et al 2012: 82). Como resultado de ello, protegen las células contra el daño oxidativo, y por tanto, pueden prevenir enfermedades crónicas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y la diabetes. (Fernández-León et al, 2011:191-2). La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se relaciona con su estructura química que les confiere propiedades redox. (Quiñones et al, 2012:77).

La coliflor es una variedad de la especie *Brassica oleracea* L. en el grupo *Botrytis* de la familia Brassicaceae, contiene glucosinolatos, indol-3-carbinol, isotiocianato y sulforranos con propiedades antioxidantes, importantes para la prevención de muchas enfermedades ya sea cardiovasculares, oncológicas etc (Hayes et al, 2008:76). Quiñones et al (2012:81), han demostrado que los polifenoles, y especialmente la quercetina, inhiben la COX y la LPO, enzimas implicadas en la liberación de interleuquinas y quimosinas producidas por el estrés oxidativo. Sin embargo, los mecanismos de acción sobre el efecto inmunomodulador aún no están aún bien comprendidos por los investigadores.

La alta tasa de mortalidad y la falta de una cultura de prevención en cáncer, y ante la carencia de estudios realizados sobre el efecto de *Brassica oleracea L. var botrytis* “coliflor” sobre el sistema inmunológico, fue motivo de esta investigación para que con los resultados obtenidos se proporcione un sustento científico que beneficie a la comunidad, ya que este vegetal está al alcance de la población en general.

Por lo expuesto, nos planteamos: ¿Tiene el extracto obtenido de la inflorescencia de *Brassica oleracea L. var. Botrytis* efecto inmunomodulador sobre células inmunes de *Mus musculus var. Swiss* isogénicos con cáncer experimental?

Suponemos que el extracto obtenido de la inflorescencia de *Brassica oleracea L. var Botrytis* presenta efecto inmunomodulador sobre las células inmunes, incrementando el título de anticuerpos y modifica el conteo total y diferencial de leucocitos en *Mus musculus var. swiss* Isogénicos inducidos con cáncer experimental.

Objetivos

1. Obtener el extracto seco purificado de *Brassica oleracea L. var. Botrytis* “coliflor” y administrar en *Mus musculus var. Swiss* Isogénicos.
2. Inducir el cáncer experimental con Benzo(a)pireno en *Mus musculus var. Swiss* Isogénicos
3. Determinar, analizar y comparar el título de anticuerpos en los grupos experimentales.
4. Determinar y comparar el leucograma: conteo total y diferencial de leucocitos en los grupos experimentales.

II. MATERIAL Y MÉTODO

2.1 OBJETO DE ESTUDIO:

- 2.1.1 **M. Vegetal:** *Brassica oleracea L.var. Botrytis* “coliflor” procedentes del CP Pedregal-Simbal, e identificadas según la taxonomía reportado por Mostacero-León et al (2002:266).
- 2.1.2 **M. Animal:** *Mus musculus var. Swiss*, línea genética Balb/C, adquirida del Instituto de Alturas del Hospital Cayetano Heredia-Lima, machos adultos de 8 a 12 semanas de edad con un peso promedio de 35-45 g.

2.2 MEDIOS

- 2.2.1 **De vidrio y aparataje:** Uso común Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular.
- 2.2.2 **Reactivos:** fueron del grado analítico obtenidos del Laboratorio Sigma-Aldrich.
- 2.2.3 **Otros:** material hospitalario etc

2.3 MÉTODO Y TÉCNICAS

Se realizó un diseño experimental de grupos de trabajo, a los cuales se les administró el ESPC y se evaluó el título de anticuerpos, el conteo total y diferencial de leucocitos.

- 2.3.1 **Obtención del Extracto Seco Purificado de la *Brassica oleracea L. var. Botrytis* (ESPC),** se realizó con el protocolo reportado por Ruiz-Reyes, (2002:13-14).

2.3.2 Inducción del Cáncer Experimental con Benzo(a)pireno

Se utilizaron 24 ratones isogénicos estandarizados y aclimatados, luego divididos al azar en cuatro grupos de seis animales cada uno. La inducción del cáncer experimental fue realizado con α -Benzopireno (Bp), dosis 0,1 ml al 0,5 % P/V, vía subcutánea en la zona lumbar. (Aguilar y Huimán, 2003:13). El benzo(a)pireno es un hidrocarburo aromático policíclico procarcinógeno (Murray R. et al, 2013:698), que al metabolizarse se convierte en carcinógeno y ataca grupos nucleofílicos en el ADN y el ARN produciendo mutación que induce a la neoplasia y tumorigénesis (De la Peña et al, 2012:14).

Grupo Control (GC): se les indujo el tumor y al azar, se utiliza un espécimen cada 30 días para observar la evolución del efecto cancerígeno durante 90 días.

Grupo Patrón (GPa): se les indujo el tumor y después de 07 días, fueron tratados con quercitina, dosis 7.14 mg/Kg/24h/90 días/vía oral. (Pérez- Viscaino et al, 2009:69)

Grupo Problema1 (GP1): ratones que se les indujo el tumor y después de 07 días fueron tratados con el ESP de la coliflor a la dosis de 10 mg/kg/24h/90 días/vía oral.

Grupo Problema2 (GP2): ratones a las cuales se les indujo el tumor y después de 07 días fueron tratados con el ESP de coliflor a la dosis de 20 mg/kg/24h/90 días/vía oral.

Se evaluó independientemente, cada uno de los grupos experimentales y se compararon los resultados con el grupo control.

2.3.3 Determinación del Título de anticuerpos:

Inducción de anticuerpos: Con el fin de inducir la producción de anticuerpos, en los días 1,3 5 antes del experimento, se inoculó por vía intraperitoneal una suspensión de hemáties de carnero 20% en solución salina (0,9 %) a los cuatro grupos.

Estado Basal: El día 6, extraemos a todos los animales una muestra de sangre, realizando la evaluación del título de anticuerpos e iniciando la inducción del cáncer con Bp en los grupos GC, GPa, GP1 y GP2 (correspondiendo este día al estado basal).

Prueba de microhemaglutinación directa reportado por Ruiz-Alvarez et al. (2005:4).

Se toma la sangre del ratón en capilares sin heparinizar, dejamos coagular por ~20 min, separamos el suero por centrifugación (5 min). Calentando en baño a 56°C por 30 min, inactivamos el complemento del suero. En una placa de microtitulación se realiza diferentes diluciones del suero de ratón, en la proporción 1:1 con Buffer Fosfato (PBS).

Agregamos 5 uL de una suspensión al 2% v/v/ de eritrocitos de carnero en PBS (previamente lavados 4 veces) a cada hoyo, incluyendo al hoyo control negativo e incubamos en baño maría a 37°C. Dejamos sedimentar los glóbulos rojos por 2 h y observamos la presencia de aglutinación microscópica, utilizando un microscopio invertido. Un botón pequeño en el fondo del hoyo indica que las células no aglutinaron, mientras que un tapete fino que se extiende sobre un área apreciable del hoyo indica aglutinación.

Se establece como título final de anticuerpos aquella dilución en la que se presenta al menos el 50% de aglutinación.

Tratamiento de los grupos GPa, GP1 y GP2: a los 8 días de inducción del cáncer con Bp, se inicia el tratamiento con quercitina (GPa) y el ESP de coliflor (GP1 y GP2) a la dosis establecida respectivamente (Este día corresponde al primer día de tratamiento).

Se analiza a los 30, 60 y 90 días de tratamiento, en las mismas condiciones iniciales.

2.3.4 Evaluación del Leucograma reportado por Castellanos-Puerto et al (2006:2). El leucograma es la fracción del hemograma que se refiere al conteo total de los leucocitos y de las diferentes clases de leucocitos (Bernard et al, 2005:586).

Estado Basal: En GC, GPa, GP1 y GP2, tomamos una muestra de sangre del ratón, se limpia la cola con una torunda y xilol; y se administra calor con una lámpara durante 3 minutos. Se corta la punta de la cola 0-5-1 cm y se recoge dos gotas de sangre para realizar el leucograma (Conteo Total y Conteo Diferencial de Leucocitos) e iniciamos la inducción con Benzopireno.

Tratamiento de los grupos GPa, GP1 y GP2: a los 8 días de inducción con Bp, se inicia el tratamiento con quercitina (GPa) y el ESP de coliflor (GP1 y GP2) (1er día de

tratamiento), y se analiza a los 30, 60 y 90 días de tratamiento, en las mismas condiciones iniciales.

2.3.4.1 Conteo Total de Leucocitos

- 10 μ l de sangre se diluye en 0,19 ml de Solución Turk (ácido acético glacial 2% V/V, con V gotas de azul de metileno 0,3% P/V) Dilución final 1/20. La dilución se coloca en la cámara Neubauer, dejando reposar 10 min, se cuenta las células en un área de 4 mm², utilizando los cuadros numerados 1, 3, 7 y 9 en un microscopio con una lente de 10 x. Después de contar los leucocitos en los cuadrantes, sumamos el total de ellos y con dicha cantidad, realizamos el siguiente cálculo:
- N° de leucocitos x mm³ = N° de leucocitos contados x 50

2.3.4.2 Conteo Diferencial de leucocitos: neutrófilos, linfocitos y monocitos

- Se aplicó una gota de sangre a la lámina portaobjetos, realizamos el extendido, dejando secar al aire libre y fijando con metanol por 1 min. Coloreamos por el método de Giemsa (colorante a razón de una gota por mililitro de agua destilada), lavamos y secamos al aire libre. Se realizó el conteo en el microscopio utilizando una lente de inmersión, contando no menos de 100 leucocitos.
- Los resultados fueron expresados en 10⁶ células/ml (10⁹ células/l) para el conteo total de leucocitos y en porcentaje para el conteo diferencial de leucocitos.

2.3.5 Análisis Estadístico

Los datos fueron procesados con el programa Statistical Package for the Social Sciences SPSS® para Windows® versión 22 y Microsoft Office Excel® 2010. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para la determinación del título de anticuerpos, leucocitos totales y células diferencias de leucocitos. Se utilizó el test de Tukey para la diferencia y significancia estadística de $P < 0.05$. (Dawson y Trapp, 2002)

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 1: Efecto inmunomodulador del ESP de *Brassica oleracea* L. var. *Botrytis* sobre el título de anticuerpos en *Mus musculus* var. *Swiss* Isogénicos comparados en los diferentes grupos experimentales a los 0, 30, 60 y 90 días

Grupos	n	Título de Anticuerpos							
		0 días		30 días		60 días		90 días	
GC ^a	6	922.00	\pm 228.08	922.00	\pm 228.08 ^a	820.00	\pm 279.34 ^a	718.00	\pm 279.34 ^a
GPa ^{b,e}	6	922.00	\pm 228.08	1024.00	\pm 0.00 ^b	1024.00	\pm 0.00 ^b	1228.80	\pm 457.95 ^b
GP1 ^{c,e}	6	922.00	\pm 228.08	1024.00	\pm 0.00 ^c	1228.80	\pm 457.95 ^c	1433.60	\pm 560.88 ^c
GP2 ^{d,e}	6	922.00	\pm 228.08	1228.80	\pm 457.95 ^d	1433.60	\pm 560.88 ^d	1638.40	\pm 560.88 ^d

Fuente: Registros de Laboratorio. Los valores expresan el promedio \pm DS

Leyenda: GC: Con cáncer experimental (Bp);

GPa: cáncer experimental (Bp) + Quercitina D=7.14 mg/kg/pc;

GP1: cáncer experimental (Bp)+ESPC D=10 mg/kg/pc;

GP2: cáncer experimental (Bp)+ESPC D=20 mg/kg/pc;

P: Nivel de Significancia $P < 0.05$. Letras desiguales difieren significativamente a,b,c,d,e.

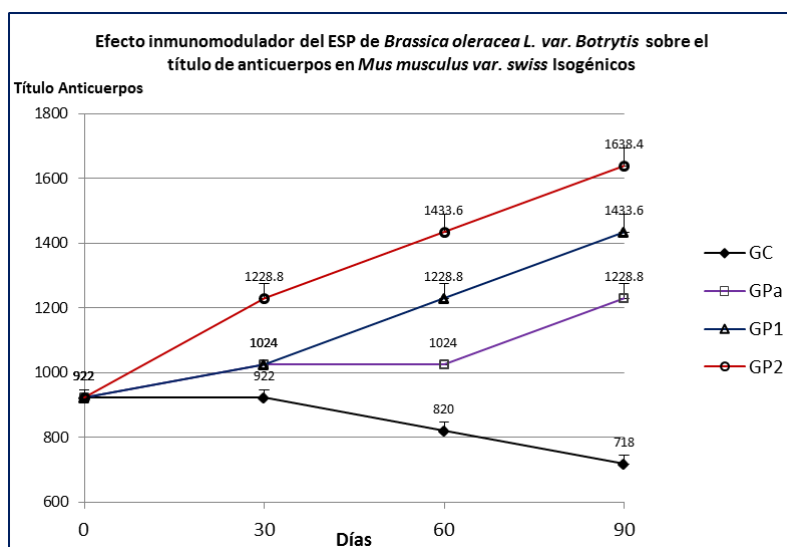


Figura 1. Efecto inmunomodulador del ESP de *Brassica oleracea* L. var. *Botrytis* sobre el título de anticuerpos en *Mus musculus* var. *Swiss* Isogénicos con cáncer experimental.

En la tabla 1, se observa que los grupos GPa, GP1 y GP2, elevan su nivel de anticuerpos comparados con GC, observando que a los 90 días el título de anticuerpos es mayor en GP2 (1638.40 ± 560.88) y GP1 (1433.60 ± 560.88) que GPa (1228.80 ± 457.95) comparado con GC (718.0 ± 279.34) siendo estos valores significativos ($P < 0.05$) Ver figura 1

Tabla 2: Análisis de Varianza en Diseño en bloque completo al azar de los Anticuerpos

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	Gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Día	1126810,600	3	375603,533	3,091	0,032
Grupo	1829483,800	3	609827,933	5,019	0,003
Error	8870121,400	73	121508,512		
Total corregido	11826415,800	79			

FUENTE: Registros de Laboratorio – SALIDA SPSS VER 22

En la tabla 2, se muestra el análisis de varianza en diseño en bloque completo al azar de los anticuerpos, observando diferencia significativa entre grupos ($F=5.019$, $P < 0.05$) y días de tratamiento ($F=3.091$, $P < 0.05$).

Tabla 3: Análisis de Comparaciones Múltiples del número promedio de los Anticuerpos, entre Grupos

GRUPO		Diferencia de medias	Error estándar	Sig.
Grupo Control	Grupo Patrón	-306,60	110,231	0,034
	Grupo P1	-204,80	110,231	0,048
	Grupo P2	-409,00	110,231	0,002
Grupo Patrón	Grupo P1	102,40	110,231	0,789
	Grupo P2	-102,40	110,231	0,789
Grupo P1	Grupo P2	204,80	110,231	0,255

FUENTE: Registros de Laboratorio – SALIDA SPSS VER 22

En la tabla 3, se muestra el análisis de comparaciones múltiples del número promedio de los anticuerpos entre Grupos observando que hay diferencia significativa de GPa, GP1 y GP2 comparado con GC ($P < 0.05$). Sin embargo al comparar los grupos tratados GPa, GP1 y GP2, se

observa que no existe diferencia entre ellos ($P > 0.05$), suponiendo que tanto la quercitina como los flavonoides obtenidos del extracto seco purificado presentan similares mecanismos.

El efecto inmunomodulador del extracto seco purificado de la coliflor (ESPC), se observa a los 90 días de tratamiento, cuando GP1 y GP2 presentan mayor el título de anticuerpos y podría deberse a la acción sinérgica de los flavonoides presentes en el ESPC, como son la quercitina y el kaempferol.

El sistema inmunológico juega un papel importante en la regulación del crecimiento tumoral (Sirera et al, 2006:43). La respuesta inmune tumoral es una red compleja formada por células y mensajeros químicos que actúan de manera colectiva para destruir o eliminar células no propias. (Ramírez-Flores, 2004:5) si las células tumorales expresan antígenos inmunogénicos débiles, no propios para el huésped, entonces es posible que la respuesta inmunitaria no pueda evitar el crecimiento de tumores, por lo que es necesario que el sistema inmune se active y sea capaz de reconocer y destruir esas células anormales y erradicar los tumores (Abbas et al., 2011:398-99, 416).

Como sistema de defensa frente al cáncer, los linfocitos B se transforman en células plasmáticas que secretan inmunoglobulinas (anticuerpos) los cuales están dirigidos contra antígenos tumorales (Arango et al, 2008:194). El mecanismo por anticuerpos involucra: la lisis mediada por complemento, opsonización y fagocitosis, y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) (Abbas et al, 2011:16). Los linfocitos T reaccionan contra el antígeno liberando citoquinas (MacPherson y Austin, 2013:60).

Varios estudios epidemiológicos han demostrado que los cambios en la composición de la dieta pueden afectar a la respuesta inmunológica. (Ballester, 2006:3). El extracto obtenido de la coliflor contiene alto contenido de polifenoles como el kaempferol y quercitina, ambos pueden presentar efecto anti-inflamatorio, antialérgico, vascular y antitumoral, pero la acción más importante de compuestos fenólicos es su actividad antioxidante (Barrón-Yañez, 2011:151). La capacidad antioxidante de los flavonoides y ácidos fenólicos está relacionado con el número y posición de grupos hidroxilo en la molécula; un aumento en el número de grupos hidroxilo conduce a una mayor actividad antioxidante (Cartea et al, 2011:256). En el organismo, la quercetina es metabolizada con ácido glucurónico, sulfato y metilos; encontrando en plasma quercetina-3-glucurónido, quercetina-3'-sulfato y 3'-metil-quercetina-3-glucurónido (Menéndez-Soriano, 2012:27)

Según los resultados, se observan que en los animales tratados con quercitina y el ESP de la Coliflor, incrementan la producción de anticuerpos, lo que podría generar una respuesta antitumoral contra el efecto cancerígeno producido por el Bp, atribuyendo el efecto inmunomodulador a la quercitina por sus propiedades:

1) **Anti-inflamatorias** porque: inhibe la enzimas Ciclooxygenasa (COX) y la lipooxygenasa (LPO) relacionadas con la liberación de factores como interleuquinas y quimosinas producido por el estrés oxidativo (Quiñones et al, 2012:81), disminuye la expresión génica, inhibe de la síntesis de mediadores proinflamatorios inducidos diversas citoquinas como el Factor de Necrosis Tumoral (TNF) o la IL-1 β en macrófagos (Kim et al., 2004:229) y disminuye la producción de interleucinas IL-1 β , IL-6 e IL-8 en células estimuladas con ésteres de Forbol y calcio ionóforos (Min et al, 2007:210)

2) **Antioxidantes** porque: aumenta la actividad de la glutatión peroxidasa y disminuye los niveles de malondialdehído (Perez-Viscaino, 2009:71), interviene en reacciones redox captando el oxígeno activo especialmente en forma de anión superóxido, radicales hidroxilo, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos (Ballester, 2006:24), inhibe la peroxidación lipídica producida por hierro (Ballester, 2006:25) e incrementa los niveles tanto de GSH, de glutatión total y el índice de GSH / GSSG, causa elevación rápida y simultánea en las actividades de la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa (Vásquez-Garzón et al, 2008:128).

Tabla 4. Efecto del ESP de *Brassica oleracea* L. var. *Botrytis* sobre los niveles promedio del conteo total y diferencial de leucocitos en *Mus musculus* var. *Swiss* Isogénicos comparados en los diferentes grupos experimentales a los 0, 30, 60 y 90 días.

Grupos	Pruebas hematológicas	Tiempo (días)			
		0	30	60	90
GC	Leucocitos 10 ⁹ cél/L	6.36 ± 1.15	10.78 ± 0.93	11.38 ± 0.65	4.94 ± 0.77 ^a
	Neutrófilos (%)	47.40 ± 3.58	63.60 ± 5.55	53.80 ± 4.87	54.20 ± 4.66 ^a
	Linfocitos (%)	51.60 ± 3.97	35.20 ± 4.66	44.60 ± 5.64	43.40 ± 4.04 ^a
	Monocitos (%)	1.00 ± 1.22	1.20 ± 1.30	1.60 ± 1.52	2.40 ± 1.95 ^a
GPa	Leucocitos 10 ⁹ cél/L	6.58 ± 1.44	9.76 ± 0.92	7.68 ± 0.64	6.84 ± 0.83 ^b
	Neutrófilos (%)	47.40 ± 5.32	50.40 ± 7.09	45.20 ± 3.27	44.00 ± 4.53 ^c
	Linfocitos (%)	51.60 ± 5.68	48.80 ± 6.53	54.00 ± 3.61	55.60 ± 5.03 ^d
	Monocitos (%)	1.00 ± 1.0	0.80 ± 0.45	0.80 ± 0.45	0.40 ± 0.55 ^e
GP1	Leucocitos 10 ⁹ cél/L	6.84 ± 1.01	10.12 ± 1.21	8.02 ± 0.83	6.76 ± 1.00 ^b
	Neutrófilos (%)	43.20 ± 4.92	52.20 ± 5.72	47.20 ± 3.36	43.80 ± 6.22 ^c
	Linfocitos (%)	53.00 ± 4.85	47.20 ± 5.54	53.20 ± 3.27	56.00 ± 6.04 ^d
	Monocitos (%)	0.80 ± 0.45	0.60 ± 0.55	0.20 ± 0.45	0.20 ± 0.45 ^e
GP2	Leucocitos 10 ⁹ cél/L	6.28 ± 1.08	9.68 ± 0.90	7.24 ± 10.93	6.40 ± 0.32 ^b
	Neutrófilos (%)	46.20 ± 5.26	51.60 ± 6.66	45.40 ± 4.93	42.40 ± 3.36 ^c
	Linfocitos (%)	52.80 ± 5.67	48.00 ± 6.24	54.40 ± 5.22	57.60 ± 3.36 ^d
	Monocitos (%)	0.00 ± 1.22	0.40 ± 0.55	0.20 ± 0.45	0.00 ± 0.00 ^e

Fuente: Registros de Laboratorio. Los valores expresan el promedio ± DS

Leyenda: GC: Con cáncer experimental (Bp); GPa: cáncer experimental (Bp) + Quercitina D=7.14 mg/kg/pc;

GP1: cáncer experimental (Bp)+ESPC D=10 mg/kg/pc; GP2: cáncer experimental (Bp)+ESPC D=20 mg/kg/pc;

P: Nivel de Significancia P < 0.05. Letras desiguales difieren significativamente a,b,c,d,e.

En la tabla 4, se muestra el efecto del ESP de la coliflor sobre el conteo total de leucocitos y conteo diferencial de células neutrófilos, linfocitos y monocitos, observando que al inicio se incrementaron los leucocitos en todos los grupos experimentales; debido al proceso inflamatorio se produce leucocitosis, como mecanismo de repuesta frente al daño tumoral (Bruzzo, 2007:470), sin embargo a los 90 días, los valores de leucocitos son normales en GPa, GP1 y GP2 mientras que el GC presenta leucopenia posiblemente debido a las alteraciones neoplásicas producidas por el Bp y sus productos de metabolismo. A pesar que todos los leucocitos actúan defendiendo al organismo, las células diferenciadas como neutrófilos, linfocitos y monocitos difieren en sus funciones y es mejor evaluarlos como sistemas separados (Bernard et al, 2005:587).

Respecto a los neutrófilos, a los 30 días, se presenta neutrofilia en los grupos debido a que estas células constituyen la población más abundante de leucocitos circulantes e intervienen en las primeras fases de las respuestas inflamatorias, caracterizada por la hiperproducción de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno, agentes oxidantes que pueden desencadenar por sí solos una

respuesta inflamatoria. Los neutrófilos regulan la respuesta inflamatoria a través de la absorción y liberación de citocinas y quimiocinas (Basran, 2013:19); el factor estimulador de las colonias de granulocitos (G-CSF) activa su producción (Abbas et al, 2011:29). El crecimiento del tumor es acompañado por una reacción inflamatoria sistémica, evidenciada tanto por neutrofilia, como por un aumento sérico de TNF- α , IL-1 β , IL-6, CRP, SAA y de citoquinas. (Bruzo et al, 2007:470). Sin embargo a los 90 días, GP_a, GP1 y GP2 presentan valores normales de neutrófilos mientras que el GC presenta neutropenia causado por el cáncer inducido experimentalmente.

Asimismo, a los 30 días, se presenta linfopenia en los grupos experimentales, sin embargo a los 90 días, GP_a, GP1 y GP2 presenta valores mayores de linfocitos que el GC, siendo significativos ($P < 0,05$). Los linfocitos son las únicas células capaces de reconocer antígenos de manera específica y responden mediante su proliferación y diferenciación en células efectoras, cuya función consiste en eliminar el antígeno; y en células de memoria, con una respuesta mayor tras su encuentro posterior con el antígeno (Abbas et al, 2011:17).

Por otro lado, se observa monocitopenia entre los grupos GP_a, GP1 y GP2 en cambio el GC presenta monocitosis hasta los 90 días. Una variedad de factores, incluyendo infecciones bacterianas, cáncer, estrés y quimioterapia, provocan aumento o disminución del número de neutrófilos y monocitos. Los neutrófilos y los monocitos (precursores de macrófagos tisulares) emigran desde la sangre hacia los focos inflamatorios durante la respuesta de la inmunidad innata, cuando estos disminuyen su actividad se incrementan las citosinas, que resultan nocivo e incluso puede provocar la muerte del huésped. (Abbas et al, 2011:45-46).

Se observa que, a los 30 días, todos los grupos presentaron leucocitosis por el proceso carcinógeno, reflejando mayor % en neutrófilos y monocitos y menor % en linfocitos; sin embargo a los 90 días, observa que el GC presenta leucopenia; siendo los linfocitos las células más afectadas en GC que al compararlos con GP_a, GP1 y GP2, la diferencia es significativa ($P < 0,05$).

Tabla 5: Análisis de Varianza en Diseño en bloque completo al azar del Conteo Total y Diferencial de Leucocitos: Neutrófilos, Linfocitos y Monocitos en los grupos experimentales y días de tratamiento.

Prueba Hematológica	Origen	Tipo III de suma de cuadrados	Gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Leucocitos	Día	198,281	3	66,094	40,969	0,000
	Grupo	9,881	3	3,294	23,042	0,048
	Error	117,768	73	1,613		
	Total corregido	325,929	79			
Neutrófilos	Día	886,250	3	295,417	10,985	0,000
	Grupo	958,450	3	319,483	11,879	0,000
	Error	1963,250	73	26,894		
	Total corregido	3807,950	79			
Linfocitos	Día	873,238	3	291,079	10,428	0,000
	Grupo	1218,738	3	406,246	14,554	0,000
	Error	2037,713	73	27,914		
	Total corregido	4129,688	79			
Monocitos	Día	0,738	3	0,246	0,273	0,845
	Grupo	16,938	3	5,646	6,272	0,001
	Error	65,713	73	0,900		
	Total corregido	83,388	79			

FUENTE: Registros de Laboratorio – SALIDA SPSS VER 22

En la tabla 5, se muestra el análisis de varianza en diseño en bloque completo al azar del Conteo Total y Diferencial de Leucocitos: Neutrófilos, Linfocitos y Monocitos en los grupos experimentales y días de tratamiento; observando que el número promedio de leucocitos $\times 10^9$ células/L, es significativo entre grupos ($F=40,969$, $P < 0,05$) y días de tratamiento ($F=23,042$, $P < 0,05$); además, hay diferencia significativa, en el porcentaje de neutrófilos ($F=10,985$ $P < 0,05$) ($F=11,879$ $P < 0,05$); linfocitos ($F=14,554$, $P < 0,05$) ($F=10,428$, $P < 0,05$) entre grupos y días de

tratamiento; sin embargo, sólo hay diferencia del porcentaje de monocitos entre grupos ($F=5,646$, $P<0.05$) pero no entre días de tratamiento ($F=0,273$, $P>0.05$).

Tabla 6: Diferencia Mínimas Significativas de la variación de Leucocitos 10^9 células/L entre los Grupos Experimentales

Prueba Hematológica	Grupos Experimentales		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Leucocitos 10 ⁹ cél/l	GC	Inter-grupos	153,366	3	51,122	63,505	0,000
		Intra-grupos	12,880	16	0,805		
		Total	166,246	19			
	GPa	Inter-grupos	36,806	3	12,269	11,768	0,000
		Intra-grupos	16,680	16	1,042		
		Total	53,486	19			
	GP1	Inter-grupos	31,185	3	10,395	10,305	0,001
		Intra-grupos	16,140	16	1,009		
		Total	47,325	19			
	GP2	Inter-grupos	37,301	3	12,434	17,016	0,000
		Intra-grupos	11,692	16	0,731		
		Total	48,992	19			

En la tabla 6, se muestra la diferencia mínima significativa de la variación del conteo total de leucocitos 10^9 células/L entre grupos, observando que hay diferencia entre GPa ($F=11,768$, $P<0,05$), GP1 ($F=10,305$, $P<0,05$), y GP2 ($F=17,016$, $P<0,05$), comparados con GC ($F=63,505$, $P<0,05$).

Los leucocitos, tienen la función de defensa contra virus, bacterias y agentes xenobióticos; constituyen los neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos. (Abbas et al, 2011:49). Los leucocitos, se incrementan en procesos de inflamación celular (Abbas et al, 2011:29) y se ha reportado que la quercetina y la isoramnetina presentan propiedades anti-inflamatorias en los macrófagos RAW264.7; observando un aumento en los niveles de la proteína hemooxigenasa-1, una diana del factor de transcripción Nrf2, conocido por ser un antagonista de la inflamación crónica (Boesch-Saadatmandi et al., 2010:293).

Tabla 7: Análisis de Varianza en Diseño en bloque completo al azar de las células diferenciadas de leucocitos: Neutrófilos, Linfocitos y Monocitos en los grupos experimentales

	GRUPOS EXPERIMENTALES		Diferencia de medias	Error estándar	Sig.
Neutrófilos	GC	GPa	7,550*	16,399	0,000
		GP1	8,000*	16,399	0,000
		GP2	8,350*	16,399	0,000
	GPa	GP1	0.450	16,399	0,993
		GP2	0.800	16,399	0,962
	GP1	GP2	0.350	16,399	0,997
Linfocitos	GC	GPa	-8,650*	16,707	0,000
		GP1	-8,800*	16,707	0,000
		GP2	-9,500*	16,707	0,000
	GPa	GP1	-0.150	16,707	1,000
		GP2	-0.850	16,707	0,957
	GP1	GP2	-0.700	16,707	0,975
Monocitos	GC	GPa	1,100*	0,3000	0,003

		GP1	0,800*	0,3000	0,046
		GP2	1,150*	0,3000	0,001
	GPa	GP1	-0,300	0,3000	0,750
		GP2	0,050	0,3000	0,998
	GP1	GP2	0,350	0,3000	0,650

En la tabla 7, se muestra el análisis de varianza en diseño en bloque completo al azar de las células diferenciadas de leucocitos: Neutrófilos, Linfocitos y Monocitos en los grupos, observando que hay diferencia en el porcentaje de Neutrófilos, linfocitos y monocitos entre los grupos GPa, GP1 y GP2 comparados con GC respectivamente ($P < 0,05$); sin embargo al comparar los porcentajes de estas células entre grupos GPa, GP1 y GP2 se observa que no presentan significancia estadística ($P > 0,05$), por lo cual se podría afirmar que el ESPC tiene el mismo efecto que el patrón quercitina, sobre las células diferenciadas de leucocitos.

La quercitina presenta efecto antiinflamatorio porque inhibe las enzimas fosfolipasa A2, COX y LPO que interviene con el metabolismo de ácido araquidónico, lo que disminuye los niveles de prostaglandinas, sustancias que incrementan la respuesta inflamatoria (Menéndez, 2012:72).

La quercetina presenta efecto antioxidante porque ejerce efectos duales sobre el estrés oxidativo y el óxido nítrico; es capaz de actuar directamente sobre el O_2^- anión superóxido e inhibir la oxidación de LDL (Lodi et al. 2008:741); es capaz de reducir el aumento inducido por el $TNF-\alpha$ en las moléculas de adhesión VCAM-1, ICAM-1 y MCP-1, tanto a nivel de la proteína como del ARNm en el endotelio humano y en las células del músculo liso vascular. (Menéndez, 2012:49), y junto a otros flavonoides inhiben la producción de $TNF-\alpha$, así como la expresión de la NOS inducible (iNOS) y la producción de NO en macrófagos activados por lipopolisacáridos, un efecto que se ha asociado con la inhibición de la vía NF-kB, a través de la inhibición de la fosforilación de I κ B- α (Comalada et al, 2006).

Middleton et al. (2000:675), señala que los flavonoides actúan modulando la respuesta de linfocitos T, linfocitos B, macrófagos y monocitos, mastocitos, basófilos, neutrófilos, eosinófilos y plaquetas.

Aguilar et al, (2009:22) manifiesta que los flavonoles quercetina y kaempferol son potentes inhibidores de la liberación de histamina en los mastocitos de peritoneo de ratas.

Por lo tanto, el ESP de *Brassica oleracea L. var. Botrytis*, “coliflor”, presenta efecto inmunomodulador y se le atribuye a la quercitina por sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes como respuesta inmune y defensa favorable contra el cáncer; cuyo efecto dual de la quercitina es sinérgico con la presencia del flavonoide kaempferol presente el ESPC.

Asimismo, se considera necesario difundir el consumo frecuente de la coliflor en la dieta, de la población, como un medio de prevenir el cáncer.

IV. CONCLUSIONES

1. El cáncer experimental fue inducido con Benzo(a)pireno a la dosis 0,1 ml al 0,5% P/V, vía subcutánea en la zona lumbar de *Mus musculus var. Swiss*.
2. El ESPC presenta efecto inmunomodulador porque incrementa el título de anticuerpos y el porcentaje de linfocitos en *Mus musculus var. Swiss* Isogénicos como defensa contra el cáncer experimental siendo estos valores estadísticamente significativo comparado con el control ($P < 0,05$)
3. El efecto inmunomodulador del ESPC se le atribuye a la quercitina por sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, cuyo efecto dual es sinérgico por la presencia del flavonoide kaempferol en el ESPC.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento especial a mi asesor Dr. Carlos Sabana Gamarra, a los miembros del Laboratorio de Bioquímica y Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica-UNT, por su apoyo en la realización del presente trabajo.

V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A., LICHTMAN, A., PILLAI, SH. 2011. **Inmunología Celular y Molecular**. 7ª ed. Ed. Elsevier. España. Pp 397-440
- AGUILAR, E. & BONILLA P. 2009. **Antioxidant activity and immunological of flavonoids isolated from leaves of *Smallanthus sonchifolius* (yacón)**. Ciencia e Investigación; 12(1): 15-23. UNMSM. ISSN 1561-0861.
- AGUILAR, S., HUIMÁN, C. 2003. **Efecto de la suspensión oleosa del lipopolisacárido de *Salmonella Typhi* sobre carcinogénesis química inducida con 3,4-Benzopireno administrado por vía subcutánea en *Mus musculus* var. *swiss***. Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico. Fac. Farmacia y Bioquímica-UNT. Pp 63.
- ARANGO, M., FAXA, M., ÁLVAREZ, I., CAMACHO, R., RODRÍGUEZ, C. 2008. **Compromiso del Sistema Inmune en Pacientes con Cáncer de Mama**. *Cancerología*, Vol 3:191-197.
- BAKER, M. & DÍAZ, S. 2013. **Protooncogenes, Oncogenes y Genes supresores de tumores, Un enfoque evolutivo**. Facultad de Biología. Universidad San Cristóbal de la Laguna, España. Pp.15
- BALLESTER M. 2006. **Relación estructura-actividad de los flavonoides como agentes antiinflamatorios intestinales**. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada, España. Pp.2-177.
- BARRÓN-YÁNEZ, R., GARCÍA-MATEOS, M., SOTO, M., COLINAS-LEÓN, T. KITE, G.2011. **Flavonoides y Actividad Antioxidante de *Calia secundiflora* (Ort.) *Yakovlev***. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol 34 (3):151 – 157.
- BASRAN, A., JABEEN, M., BINGLE, L., STOKES, C. et al. 2013. **Roles of neutrophils in the regulation of the extent of human inflammation through delivery of IL-1 and clearance of chemokines**. *J Leukoc Biol*; 93(1): 7-19.
- BERNARD, H., DAVEY, F., HERMAN, CH., MCPHERSON, R., PINCUS, M. 2005. **Henry. El Laboratorio en el Diagnóstico clínico. Homenaje a Todd-Sanford & Davidsohn**. 20ª ed. Ed. Marbán S.L. España. Pp.586-622, 817-1028.
- BOESCH-SAADATMANDI, C., LOBODA, A., WAGNER, A., STACHURSKA, A., JOZKOWICZ, A. et al. 2010. **Effect of quercetin and its metabolites isorhamnetin and quercetin-3-glucuronide on inflammatory gene expression: role of miR-155**. *J Nutr Biochem*, 22:293-299.
- BOTICARIO, C., CASCALES, M. 2013. **Sistema inmune: su importancia en el desarrollo y terapia del cáncer**. UNED. Centro de Plasencia. D.L.: CC-154-2013. I.S.B.N.: 978-84-616-4319-6. Pp: 9-10
- BRUZZO, J., CHIARELLA, P., FERNANDEZ, G., BUSTUOABAD, O., RUGGIERO, R. 2007. **Cáncer experimental e inflamación sistémica en un modelo murino**. *Medicina* [online], Vol.67(5): 469-474. ISSN 1669-9106.
- CARTEA, M., FRANCISCO, M., SOENGAS, P., VELASCO, P. 2011. **Phenolic Compounds in Brassica Vegetables**. *Molecules*, 16(1):251-280.
- CASTELLANOS-PUERTO, E., SEBAZCO-PERNAS, C., FERNÁNDEZ, M., PÉREZ-SANTOYA, P. 2006. **Alteración de los niveles leucocitarios en ratones BALBH/C sometidos a estrés**. *Rev Cubana Invest Biomed*, 25(2):1-5.

- COMALADA, M., BALLESTER, I., BAILON, E., SIERRA, S., XAUS, J., GALVEZ, J. et al. 2006. **Inhibition of proinflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure-activity relationship.** *Biochem Pharmacol*, 72:1010-1021.
- DAWSON, B., TRAPP, R. 2002. **Bioestadística médica.** 3era Edición. Editorial El Manual Moderno, México. Pp: 27-61,179-200, 267-279.
- DE LA PEÑA, E., HERRERA, O., GARCÍA, P., PÉREZ, C., GUTIÉRREZ, C., AYAL, F. et al. 2012. **Mutagénesis y carcinogénesis química.** En M. Repetto (ed.) Postgrado en Toxicología. Ilustre Colegio Oficial de Químicos. Sevilla. ISBN:13: 978-84-695-3142-6. Depósito Legal: SE-1047-08
- EID, N., WALTON, G., COSTABILE, A., KUHNLE, G., SPENCER, J. 2013. **Polyphenols, glucosinolates, dietary fibre and colon cancer: Understanding the potential of specific types of fruit and vegetables to reduce bowel cancer progression.** *Nutrition and Aging*, 2 (2013/2014):45–67. DOI 10.3233/NUA-130029.UK.
- FERNÁNDEZ-LEÓN, M., FERNÁNDEZ-LEÓN, A., LOZANO, M., AYUSO, M., GONZÁLEZ J.A., GONZÁLEZ-GÓMEZ, D. 2011. **Antioxidantes naturales y capacidad antioxidante en Brassicas.** *Actas de Horticultura*, 58:191-194
- FRANCO-TOBÓN YN, RAMÍREZ-BOTERO CL. 2013. **El benzo(a)pireno en los alimentos y su relación con el cáncer.** *Perspect Nut Hum*, 15(1): 99-112.
- GAVILONDO-COWLEY, J. 2014. **Los caminos de un fármaco antitumoral.** *Rev Cubana Salud Pública* [revista en la Internet], [citado 2014 Nov 29]; Vol 40(2): 212-221. ISSN 0864-3466. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-34662014000200006&lng=es
- HAYES, J.D., KELLEHER, M.O., EGGLESTON, I.M. 2008. **The cancer chemopreventive actions of phytochemicals derived from glucosinolates.** *European Journal of Nutrition*, 47(2):73-88.
- KIM, H., SON, K., CHANG, H., KANG, S. 2004. **Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms.** *J Pharmacol Sci*; 96:229-45.
- LODI, F., JIMÉNEZ, R., MENENDEZ, C., NEEDS, P., DUARTE, J. PÉREZ-VIZCAINO, F. 2008. **Glucuronidated Metabolites of the Flavonoid Quercetin do not Auto-Oxidise, do not Generate Free Radicals and do not Decrease Nitric Oxide Bioavailability.** *Planta Med*, 74: 741–746.
- MACPHERSON, G., AUSTIN, J. 2013. **Inmunología. Conceptos y Evidencias.** 1ª ed. Ed. Mc Graw Hill- España. Pp 5-46, 95-97, 306-11.
- MENÉNDEZ-SORIANO, C. 2012. **Efectos vasculares de la quercetina y la catequina: interacciones y papel de los procesos de conjugación y desconjugación metabólica.** Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Facultad De Medicina, Departamento De Farmacología. España. Pp.1-147.
- MIDDLETON, E., KANDASWAMI, C., THEOHARIDES, T. 2000. **The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer.** *Pharmacol Rev*, 52:673-751.
- MIN, Y.D., CHOI, C.H., BARK, H., SON H.Y., PARK, H.H. et al. 2007. **Quercetin inhibits expression of inflammatory cytokines through attenuation of NF-κB and p38 MAPK in HMC-1 human mast cell line.** *Inflammation Research*, 56(5), 210-215.
- MOSTACERO-LEÓN, J., MEJÍA, F., GAMARRA, O. 2002. **Taxonomía de las Fanerógamas Útiles del Perú.** Vol. I. Editorial Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC). Registrado en la Biblioteca Nacional del Perú con certificado de Depósito Legal N° 1301012002 - 0438. Perú. Pp.266-67.

- MURRAY,R., BENDER,D., BOTHAM,K., KENNELLY,P., RODWELL,V., WEIL,A. 2013: **Harper: Bioquímica ilustrada**.Cap.55:Cáncer: Una perspectiva general. 29ava ed. Editorial Mc Graw Hill-España. Pp 696-717
- PÉREZ-VIZCAINO, F., DUARTE, J., JIMÉNEZ, R., SANTOS-BUELGA, C., OSUNA, A. 2009. **Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin**. *Pharmacological Reports*, 61:67–75. ISSN 1734-1140
- QUÍÑONES, M., MIGUEL, M., ALEIXANDRE, A. 2012. **Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular**. *Nutr. Hosp* [online], Vol. 27(1):76-89. ISSN 0212-1611.
- RAMÍREZ-FLORES, A. 2004. **Efecto del inmunomodulador t-activina sobre la respuesta inmune celular de ratones inmunosuprimidos con el linfoma 1-5178-y**. Tesis para grado de Doctor en Ciencias Fisiológicas con Especialidad en Fisiología, Universidad de Colima, Colombia. Pp. 1-110.
- RUIZ-REYES, G. 2002. **"Métodos de Extracción de Flavonoides"**. Trabajo de Habilitación, para ingreso a la Docencia en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, Perú. Pp. 13-20.
- SIRERA, R., SÁNCHEZ, P. CAMPS, C. 2006. **Inmunología, Estrés, Depresión y Cáncer**. Consorcio Hospital General Universitario de Valencia. *Psicooncología*, Vol 3(1): 35-48.
- STATISTICAL PACKAGE FOR THE SOCIAL SCIENCES SPSS® para Windows® versión 22 y Microsoft Office Excel® 2010.
- VÁSQUEZ-GARZÓN, V., ARELLANES-ROBLED0, J., GARCIA-ROMAN, R., APARICIO-RAUTISTA, D., & VILLA-TREVIÑO, S. 2008. **Inhibition of reactive oxygen species and pre-neoplastic lesions by quercetin through an antioxidant defense mechanism**. *Free radical research*; 43(2):128-137.